生物技術在果樹育種上之應用

劉 邦 基
台灣省農業試驗所

摘 要

傳統的果樹育種工作由於受到果樹的遺傳特性與生長習性之影響，往往成效不彰。生物技術的發展與應用則為果樹育種提供了新的方法與途徑，可望提昇品種改良之效率。本文就生物技術中的組織培養、細胞融合、RFLP分析、和遺傳工程等四大項目，探討其對果樹育種的應用潛力。

關鍵字：果樹、育種、生物技術、同功酶、限制段多形性、遺傳工程、組織培養

前 言

果樹的品種改良起源甚早。雖然大部份早期的育種工作已難知其詳，但有些果樹在十九世紀甚至十八世紀時即開始用科學方法於品種改良，例如：蘋果、梨、草莓、桃和柑桔等即是。進入二十世紀以後，許多果樹皆進行大規模的計畫性育種工作，包括多種主要的溫帶果樹，以及熱帶水果中的鳳梨、柑桔、酪梨，和百香果等。然而，從現今的果樹栽培品種中，我們可以發現它們極少來自傳統的育種程序，例如鳳梨、柑桔和蘋果等即為最佳例子。此顯示果樹的育種成效遠不如一般的農藝作物（例如小麥、玉米和水稻）和園藝作物中的蔬菜和花卉，此種差異頗值得深思。

綜合言之，傳統的育種方法在果樹品種改良上不易奏效的原因約有如下數端：㈠長久的幼年期和生命週期降低了育種效率。㈡大部分果樹的樹體均極龐大，不利於大量材料的培育、觀察和選拔。㈢高度異質結合的基因型使純系材料不易獲得，因而一般育種學上的試驗族群殊難建立。㈣許多性狀係受微效基因控制，其遺傳行為較複雜而不易掌握。㈤部份果樹具有多胚現象（例如芒果和柑桔），珠心胚苗的存在使遺傳研究和育種選拔增添不少困擾，因而不易獲得精確的資料。㈥遺傳學資料的貧乏，此與上述之各項因素可互為因果，而益增果樹育種之困難。

上述原因不但使果樹育種成效不彰，同時亦使果樹之遺傳研究不易實施。基於此原因，Cameron和Soost在討論柑桔育種時即曾斷言：若此等情況不能有效地克服，則未來柑桔的品種改良仍將難以獲致顯著之進展。此一推斷對於一般果樹而言亦當不離譜。近年來，由於生物技術的發展為植物育種提供了新的途徑，也使果樹品種改良有了嶄新的希望，本文擬就此課題加以探討。

何謂生物技術

廣義的生物技術（biotechnology）泛指一切應用生命科學的原理與方法於生產上，以求增進人類福祉之技術。依此定義，凡是利用生物的特性以達到生產物資和改進事物等目的的技術皆可稱爲生物技術；其範圍可謂甚廣，舉凡醫學、農耕、畜牧、水產、林業、食品加工和養蠶事業等皆屬之；在此定義下，人類對生物技術的開發與應用已有數千年歷史。狹義的生物技術則指：直接利用或仿造活體功能，使其依生物程序（biological processes）創造有用物資之技術；在此定義下，其範圍仍然十分廣泛，舉凡醫藥工業、應用微生物學、以及許多農業技術……等等,皆可納入其範疇。可惜無論廣義或狹義的定義皆不切合本文討論之課題。

二十世紀中葉以後，由於生物學的突飛猛進導致生物化學的起飛和分子遺傳學的興起，同時微生物學的應用領域亦因以擴大。這一來，在生物材料的應用上遂逐漸形成一門極具潛力的新興科技，而爲各國所重視；最近歐美日各國遂有將生物技術之涵意給予更明確界定之舉，裨便於科技發展政策之擬定與推展。然而，由於生物技術是由多種不同學科和技術所組成的綜合體，每個部門各有其特質，加以人爲强調的重點常有不同，因此殊難統一界定其範圍。目前比較具體的定義是：利用微生物技術、酵素技術、重組DNA、基因操作技術、或動植物組織培養以達成製造或改良產品之目的的技術體系，稱爲生物技術。若以農業的立場而言，則生物技術主要包括：(1)植物組織培養、(2)植物細胞融合、(3)同功酶和 RFLP 技術、以及(4)遺傳工程等四大要項。茲就此四大要項之發展與應用，探討其對果樹育種之意義及未來發展之潛力。

植物組織培養在果樹育種上的應用

組織培養是生物技術中最早發展，也是應用最多的部門；它在果樹育種的應用約可分爲胚培養、體細胞誘變、和花藥培養等三方面。此外，配合遺傳工程的應用（詳本文後段），使轉殖的植物細胞經由再生（regeneration）的過程以形成新的植株，亦是組織培養在果樹育種上的一項應用　。

一、胚培養

胚培養是植物組織培養中發展得極早的一項技術與方法，早在1904年即已應用於十字花科[76]。此法亦經常使用於果樹育種上，其主要目的爲拯救夭折的植物胚體與縮短育種期限。

(一)、拯救胚之夭折。某些核果類（例如櫻桃、杏、李和桃等）的早熟品種，其胚體常因種子水養分過早停止供應而夭折；因此若以早熟品種作爲育種母本，不易獲得雜交後代；在此情況下如能適時進行胚培養則可獲得雜交苗[77]。又如許多柑桔品種具有珠心胚現象，常使有性胚因受珠心胚的競爭而發育不良甚至死亡，經由胚培養則可獲得健壯的雜交苗[15]。另一種胚夭折起因於雜交不親和所導致的胚體退化或死亡，此現象常發生於種間或屬間雜交時，此時胚培養可用來拯救停止發育的胚體，這在作物育種已有甚多例子，例如棉花、水稻、大麥、番茄、和百合等。果樹育種家爲將野生木瓜的抗輪點病毒（ring spot virus）特性導入

栽培種而進行種間雜交時，亦曾透過胚培養獲取種間雜交苗[67]。

(二)、縮短育種期限。有些植物的種子由於休眠性較強而難以發芽，此種休眠機制通常位於種皮或胚乳中；若將胚單獨培養便可促進發芽而得以快速地培育出雜交後代。此法曾成功地應用於多種薔薇科果樹而節省育種時間，例如蘋果、李、梨、和桃等[77]。胚培養尚可培育出單倍體植株，例如 *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* 的大麥種間雜交，在受精後其 *bulbosum* 的基因組有時會因某種未知之原因而完全消失，形成單倍體的胚，經培養後可長成單倍體植株[76]。雖然此現象在果樹中尚未見諸報告，但將來或許可藉胚培養獲得果樹的單倍體材料。另外，有一種胚培養方式可能亦值得果樹遠緣雜交的參考，此即Williams氏利用苜蓿所建立起來的模式[84]；他將高加索苜蓿（*Trifolium ambiguum*）與白苜蓿（*T. repens*）雜交（此兩species間具有雜交不親和性），而於14-16天後採下豆莢，消毒後取出莢內的微小之幼胚，再將其幼胚放入『哺育胚乳』（nurse endosperm）中；此種遠緣雜交之幼胚和哺育胚乳隨即一起移置於培養基上令其發育成幼株。所謂哺育胚乳意指其胚乳係來自一般的非遠緣雜交而可正常地哺育幼胚以完成發育者。此法使得兩個遠緣的苜蓿種類得以順利產生雜種。此種運用哺育胚乳的方法或許值得果樹育種者借鏡。

二、體細胞誘變

以組織培養方法獲得優良變異株對於果樹品種改良而言可能具有重要意義。組織培養時，植物材料係以小塊組織、小細胞團、單獨細胞、或原生質體的形式培植於人工環境中，與完整的樹體內之細胞生活條件及生理協調方式十分不同，因而更容易受到外在之化學和物理因素的刺激而導致遺傳物質的改變，因此組織培養的突變機率較諸自然界爲高。此外，還可透過物理方式（例如放射線處理、高鹽濃度、和溫度控制等）和化學方式（例如加入各種誘變藥劑）實施人爲誘變，增加突變機率。此類變異稱爲『體細胞株變異』（somaclonal variation），其所形成的植株是選拔優良品種的理想來源[56]。

早期的組織培養由於未能建立果樹細胞的再生技術，故無法有效地應用於果數育種上；直到1970年代，果樹的組織培養技術才有顯著的進步。1971年，Altman和Goren發現離層酸（abscisic acid）可使柑桔形成大量的癒傷組織[8]；翌年，Kochba等人以甜橙的未受精胚珠之癒傷組織誘導出胚狀體[52]，Grinblat亦成功地以柑桔莖的癒傷組織誘導出小植株[29]。1974年，Abbot和Whitley誘導出蘋果的癒傷組織，並得到小植株[3]。Kochba和Spiegel-Roy更於1977年以柑桔的原生質體和細胞培養獲得再生植株，此爲果樹組織培養技術的一大突破[51]。Kochba和Spiegel-Roy進一步以柑桔細胞的再生技術爲基礎，建立果樹組織培養的誘變育種模式，所用方法包括放射線照射和抗逆境篩選等；其中之抗逆境篩選係以添加抗生素、殺草劑、或高鹽成分於培養基而實施者。Gmitter(1985)發現含有2.4-D的培養基極易引發柑桔細胞突變[37]，並因以建立大批外表具有顯著變異的植株以供篩選，他並發現該批變異植株皆具有相同的同功酶基因型。

Hammerschlag 將桃子的葉斑病（leaf spot disease）病菌（*Xanthomonas compestris* pv.

pruni）抽出液加入培養基中，用來培養桃子的癒傷組織，所培育出的試管苗經証明對葉斑病具有極佳抗性，成爲果樹中以組織培養育成抗病株系的首例[45]。由於該病原與柑桔潰瘍病（*X. campeestris* PV. *citri*）相近，因此同一方法對柑桔潰瘍病的抗病育種極有啓發價值。果樹中，利用組織培養以選育新品種的尙有香蕉。臺灣香蕉研究所在推廣組織培養苗以防除香蕉黃葉病的同時，亦從苗木中選拔出多種變異植株，經過篩選後發現部份變異株頗具栽培價值[5]。對無籽香蕉的育種而言，要在短期內育成大量具有潛力的候選植株，組織培養實爲一條理想途徑。

被子植物的胚乳是精子和兩個極核融合的產物，多屬三倍體。由於三倍體植物具有不稔性，在果樹可成爲無籽品種，如能利用胚乳培養（endosperm culture）獲取三倍體植株，將是無籽果樹育種的理想方法。理論上，同一棵樹所產生的每一粒種子之胚乳皆具有不同的基因型，因此胚乳細胞育的三倍體株群極具選拔價值。此外，在胚乳的遺傳成份中，三分之二是來自母本，僅三分之一得自花粉親，育種時或可利用此種偏向一方親本的遺傳模式，愼選雜交親本以縮短優良三倍體品種的育成時間。目前已知胚乳組織亦具有全能性（totipotency）[48]；惟胚乳培養至今僅在少數植物中實施過。已實施胚乳養的果樹包括葡萄、蘋果、人心果（*Achrs sapota*）、桃、以及柑桔中的柚子與甜橙等，大部份係中國大陸的專家所進行的研究；其中，蘋果與柑桔（包括柚子與甜橙）已可成功地誘導出三倍體小植株[3]。柑桔的胚乳培養研究最近亦在佛羅里達大學展開，並培育出大量的幼莖和少數三倍體小植株。惟柑桔的胚乳培養技術目前仍嫌不穩定，而且所育成的小植株極易死亡，顯示吾人對胚乳培養的生理與遺傳等因素尙未能充分掌握（凌緒柏和Gmitter,個人討論資料）。將來若能確立胚乳培養技術，則可爲無籽果樹育種提供一條捷徑。

三、花藥培養

花藥培養的目的在於獲得單倍體植株，再經由染色體倍加的程序育成同質雙倍體的純係品種。由於同質雙倍體植株在育種上有重要的用途，故此技術自1964年開發成功以來即廣受植物育種家重視[14]。一般果樹均具有高度異質的基因型，加以悠長的生育期，致使同質雙倍體的株係殊難經由傳統的自交途徑獲得；果樹花藥培養的最主要意義即在於克服此一瓶頸。由於花藥培養所產生的單倍體是來自單一的花粉粒，每一單株的遺傳性狀必不相同，如能經由此法產生大量的單倍體植株，以供遺傳研究與育種選拔，將是一條經濟而便捷的途徑。影響花藥培養的主要因子包括：材料（即小孢子）發育階段、培養基成分、母樹生理狀況、以及季節的變化等；此外，品種間亦有差異[14,32]。目前可由花藥培養產生單倍體植株的植物已超過一百種，尤以茄科、禾本科、和十字花科最多[14,47]。果樹的花藥培養起步較晚，實施者亦不多；已獲成功者包括葡萄、草莓、蘋果、柑桔、和木瓜等[3,25,81,91]。

植物細胞融合

植物細胞融合又稱爲體細胞雜交，它是建立在原生質體技術上的新育種方法，此法提供

了一個可超越一般雜交障礙以獲得新雜種的途徑，所育成者稱爲體細胞雜種（somatic hybrid）。自從1972年Carlson等人首次以菸草獲得體細胞雜種以後，細胞融合即廣受研究；如今已有多種體細胞雜種培育成功，大多爲茄科[14]。果樹中，1985年 Ohgawara等人首度發表甜橙（*Citrus sinensis*）與枳殼（*Poncirus trifoliata*）的體細胞雜交報告[69]；雖然此兩個不同屬的柑桔可以輕易地藉有性雜交而獲得雜種，但其細胞融合報告在果樹生物技術的發展上實具有很深的意義。翌年，Grosser亦發表相似的體細胞雜交結果[39]，此後體細胞雜交在芸香科（Rutaceaee）即屢獲進展。如今芸香科內所培育成功的體細胞雜種包括：*Citrus sinensis* ×*Severinis disticha*[40]，*C. sinensis*×*Citropsis gilletiana*（J. W. Grosser，未發表），*C. sinensis*×*C. aurantifolia*[41]，和*C. sinensis* × *C. limon*（J. W. Grosser，未發表）等。其中之前兩種組合爲無法以有性方式產生者，而且其*Citrus*以外的親本材料皆具有*Citrus*品種所缺乏的抗線蟲特性，目前已利用於砧木試驗中，（J. W. Grosser，個人討論資料）。初步觀察顯示上述芸香科體細胞雜種的性狀皆介於兩融合親本之間。各融合雜種中，*C. sinensis* × *S. disticha*已完成初步細胞學研究，顯示爲三倍體（3n＝27）；由於其融合親本皆爲2n＝18之雙倍體，而且此兩個種（species）的染色體外觀極爲相似，故無法辨認所失去的染色體究竟屬於那一方親本(萬春華,個人討論資料) 。從體細胞雜交的難易程度可知芸香科的體細胞融合性和其嫁接親和性有關，可嫁接者始可融合，而且親和力愈大者其融和細胞愈能發育成植株（J. W. Grosser，個人討論資料），因此芸香科的體細胞雜交研究可能作爲果樹細胞融合的參考模式。

同功酶和RFLP技術與果樹的遺傳和育種之關係

一、生物技術與傳統遺傳學間的橋樑

大部份高等植物的遺傳學資料至今仍甚貧乏，尤以木本植物之果樹爲甚。貧乏的遺傳學資料常使果樹育種工作宛如行舟於未經勘測的水域一般，難以預測結局。爲彌補果樹遺傳研究與育種成效的不足，良好的遺傳學資料和基因連鎖圖實甚需要。近年來，植物遺傳與育種研究已逐漸借重同功酶和RFLP的分析技術；植物遺傳學家和育種專家並已看出它們在此一領域中的應用價值。早期的植物遺傳學家在建立基因連鎖圖時，僅使用外形可辨認的形態標誌（morphological markers），並以試驗族群所提供的數據作爲數學分析的基礎。欲建立試驗族群則須先培育自交系（inbred lines），以作爲親本，凡此概殊難應用於果樹研究上，理由已略如上述。同功酶和RFLP技術則能克服此一困境，尤以後者最爲稱著，成爲生物技術與傳統遺傳學間的一道橋樑，因而可促 進果樹的遺傳研究,並且提升果樹育種效率。

二、同功酶技術的應用價值與局限性

所謂同功酶是指同一種酵素的不同形式，它們雖具有不同的分子量、電荷、或其他性質，但可進行相同的催化反應，因此可藉電泳方法顯示不同的染色條帶。此種酵素的多形性現象 (polymorphism) 是一種有用的生化標誌（biochemical markers）,可用於基因型的鑑定。

同功酶分析技術開發於1950年代，而於1960年代末期首先應用在小麥基因連鎖圖的建立[18,64]；自1970年代起則普遍地使用於果樹研究，例如桃、杏仁、酪梨、葡萄、蘋果、胡桃、麵包果（*Artocarpus altilis*）、西洋橄欖、無花果、柑桔、和阿月渾子（*Pistacia vera*）等[9,10,33,88]。其中，柑桔的同功酶研究更累積了豐富的資料，對遺傳研究和育種工作（指有性胚苗和珠心胚苗的辨別）皆有相當的助益。同功酶分析方法堪稱簡便易行，但目前可供利用的酵素種類尚十分有限，則爲其缺點。目前已知的酵素電泳染色法僅五十餘種[93]，這些酵素所涵蓋的遺傳性狀只佔高等植物基因的極小部份。再則，在此五十餘種酵素中，通常僅一部份容易產生多形性現象而有分析和研究之價值。一般而言，同一種作物若能找到十餘種具有同功酶之酵素已屬幸運。在柑桔中，已知具有同功酶的酵素達21種，其中之16種已建立詳細而明確的遺傳資料（包括基因座之數目和每一基因座之等位基因數目）[79,88]。酪梨則有12種具有同功酶之酵素見諸報告；而海棗、無花果、和桑樹則分別爲7、5、和1種。可見由於已知的有用酵素十分有限，同功酶技術在果樹遺傳和育種的應用上遂有很大的限制。

已往的研究報告顯示果樹的同功酶分析主要應用在種原鑑別上；在柑桔和酪梨則進一步應用於子代分析及雜交後代選拔[79,88,89]；在桃子曾有人探討同功酶基因型與植物生長勢（plant vigor）的關係[95]。至於應用於基因連鎖分析者，至今僅限於柑桔而已[60,90]。

三、RFLP技術之特質

RFLP是生物核酸的『限制段之長度多形性』（restriction fragment length polymorphism）的簡稱[17]，它是一種直接在核酸層面上測得的遺傳變異。由於生物核酸被限制酶（restriction enzyme）完全分解後，會形成無數特稱爲『限制段』(restriction fragments)的核酸碎片，而相同的染色體部位所產生的限制段在不同的染色體組或生物個體之間可因核酸序列的變異而造成長度上的差異，因而可供辨認，此即RFLP現象。在遺傳學上，凡是可供辨認的遺傳變異即稱爲『多形性』，因此這種由核酸長度之差異所造成的『長度多形性』（length polymorphism）便稱爲『限制段之長度多形性』。RFLP可作爲遺傳標誌，是遺傳研究和育種工作的有用工具。

RFLP分析係重組DNA技術（recombinant DNA）應用於生物遺傳研究和育種工作，以補傳統方法之不足的極佳例証，其研究須仰仗多項基因工程技術始得實施。首先須藉重組DNA以及基因選殖技術以建立生物的基因庫（gene library，或稱gene bank）；基因庫可爲基因組庫（genomic library）或互補核酸庫（complementary DNA library，簡稱cDNA library）。接著再從基因庫中篩選所需的核酸探針（probe），以利用南方氏轉漬法（Southern blotting）去偵測生物基因組核酸的變異性。偵測時，須先利用特定的核酸限制酶去分解生物的基因組核酸（genomic DNA），以產生各種不同的限制段，再用電泳方法使各限制段因長度不同而分開來，以便於轉漬並與適當的探針結合。探針之目的是用來偵測某一生物的基因組中和它相同或十分近似的核酸序列之兩近側是否有序列上的變異。一般而言，凡能偵測到生物基因組中的單套序列（single copy sequences）或單套基因(single copy

genes)的探針最有利於結果的判讀，因此是最理想的探針。核酸探針須經適當方法標示(例如以放射性元素標示)以利偵測。進行南方氏分析時，如果帶有探針序列的生物染色體部位在酶解後產生不同長度的限制段，則經過一系列的實驗程序作業後便會顯現不同的條帶樣式(banding pattern)，形成可供辨認的遺傳標誌。此種長度多形性意謂著：在生物個體或族群中，其基因組的某一位置存在著核酸序列的差異。其差異可能肇因於染色體片段之倒位（inversion）、插入（insertion）、缺失（deletion）、或氮基對替換（base pair substitution）等。

由於RFLP的研究是直接以遺傳物質的分子結構之變異性爲基礎，可不必涉及生物表現型的改變，因此與傳統的遺傳研究方法迥然不同。已知一般的生物的基因組中存在著許多不影響表現型的微細變異，稱爲沉默的突變（silent mutations），尤以染色體的非字碼區（non-coding areas）最豐富，它們是生物基因組變異的主要部份。只有RFLP分析可以測得這種沉默的突變，並研究它們對生物整體機能的影響。使用RFLP標誌尚有多種優點，例如：高靈敏度、共顯性現象（co-dominant）、分析效果穩定、以及絕無上位基因之交互感應現象（no epistatic interaction）等。但其最重要的優點則是：生物界具有極眾多的RFLP標誌。因爲每一種限制酶對於一般的生物基因組約可產生一百萬種以上的限制段，而且可供研究的限制酶已超過一百種，此數目且在逐年增加中，因此可供利用的RFLP標誌必定極其豐富[42.79]。

四、RFLP技術對果樹育種可能帶來的衝擊

由於天然的RFLP標誌之數量極其豐富，因此只需利用少數甚或單一的適當族群即可找到足夠的標誌以供分析。此一優點加上遺傳聯鎖分析方法的不斷進步（包括數學理論的發展與電腦軟體的開發），使自然族群（natural population）亦可提供足夠的訊息於基因圖的繪製上，因而免除建立自交系和試驗族群的麻煩。這一來，建立木本植物的基因圖便比以前大爲容易了[54]。

自從RFLP研究的理念在1980年首次由Botstein等人所提出，以爲人類遺傳研究之需，並於1983年首次應用於植物研究[20]，至今已有多種植物建立頗爲詳細的RFLP連鎖圖，包括玉米[42]、小麥[49]、萵苣[55]、番茄[44]、馬鈴薯[16.67]、水稻[63]和*Arabidopsis thaliana*[24.65]等。在果樹作物中，柑桔已開始進行RFLP研究，並已初步建立RFLP連鎖圖[60]。根據作者的估計，一個2-3人的實驗小組，在儀器設備和藥品的充分支援下，二、三年內便可就特定的果樹種類建立頗爲詳盡的RFLP連鎖圖；假若該果樹的基因組規模（genome size）約爲1500分摩（centimorgan，或cM），則可望在基因組的任何一段10分摩的區域內建立一個以上的RFLP標誌。有了詳細的RFLP連鎖圖，果樹中已知的單基因性狀（例如柑桔的抗Tristeza基因）亦得以輕易地加以標定。此外，由於RFLP的數量極其眾多，且其分佈遍及染色體的每一段落，因此應用統計學原理以研究數量性狀的基因群在染色體上的分佈亦得以實施[53.74]。藉此，有些番茄的數量性狀之基因分佈區已被標定在RFLP連鎖圖上，並且應用於實際育種工作[73.75.86]

。將來果樹的數量性狀亦可望利用RFLP來標定，以供育種者參考。

果樹若有了詳細的RFLP研究，對育種工作將顯出下列三大應用價值。

㈠、協助品種品系之鑑定。假設鑑定時使用十個各具有兩種形態（即兩種等位基因）的RFLP基因座作爲標誌，以測試某兩個品種或品系之相似性，若每一基因座的兩個等位基因具有相同的發生頻率（即機率皆爲50%），則此兩品種或品系得到完全一致的測試結果之機率將低於千分之一；若使用二十個RFLP標誌以行測試，其相同結果的機率更低於百萬分之一，可見其靈敏性之一般，此種特性深受植物遺傳學家和育種家的重視。如今RFLP已成功地使用在細菌和馬鈴薯的品種、品係鑑定上[36,43,56,85]。在果樹上，RFLP除了可用來探究果樹品種品系的相似性及演化關係而外[79]，若能配合有關法規之建立，將有助於保障果樹育種人員的權益。㈡、若有詳細而可靠的RFLP連鎖圖，在育種時便可以有效而具體地「監視」某些基因的導入以及子代基因型在選種過程中的變化，藉以縮短育種期限。假設某一單基因性狀和某一RFLP標誌緊密地連鎖著，則根據其距離可估算其染色體交換（crossing over）的機率，例如兩者相距0.5分摩，則表示交換機率僅爲千分之五，如此則以該RFLP作爲選拔之替代標誌以監視該有用性狀的導入，將具有99.5%的準確性，且其篩選在苗期即可實施。雖然RFLP分析至今仍屬複雜而昂貴之技術，但衡之於果樹育種往往需耗用較大的時間與空間，成本甚鉅，因而RFLP分析對果樹育種仍有其經濟效益。此外RFLP分析尙可用來監視數量性狀的基因族（gene family）在育種過程中的導入和累積情形。假設某一數量性狀之基因主要是分佈在基因組內之某兩個區域內，則可在該兩個區域選用適當的RFLP標誌（須在父母本間具有多形性者），作爲偵測該數量性狀的『基因成分』之用。例如在每個區域各選兩個RFLP標誌，則在F2族群中，每一標誌所揭示而代表該數量性狀之同質結合狀態者（即每一微效因子皆爲AA）將佔1/4之機率；而每RFLP標誌所涵蓋的區域皆爲同質結合之機率爲1/256，意即每分析256株F2植株即可發現一株。以一般的大型電泳膠來篩選（含40個跑道，可分析38個樣品，其餘兩個跑道則用來測試父母本，以供比較），則分析256株樣品需7片膠體；若使用特製之膠模（含100跑道個，可實際容納98個樣品）則僅需3片膠體便可分析294株樣品，因而在技術上仍甚經濟。以此方法作爲篩選的依據將可使有用的數量性狀在選拔族群中迅速地累積起來，以助於優異植株的獲得或理想親本的建立。此外，尙可採用一組逢機的RFLP標誌來測試子代植株的基因組與父母本的基因組間的相似程度，作爲進一步選拔的參考。凡此將可有效而具體地「監視」果樹子代基因型的變化，以縮短育種期限。㈢、RFLP研究有助於基因的轉移工作。有了詳細的基因圖，則可能發現與園藝性狀極緊密連鎖的RFLP標誌，該RFLP標誌便可作爲探針，用來探索涵蓋該有用性狀的染色體片段以找尋該基因，作爲選殖和轉移之需（詳本文後段之遺傳工程部份）。此一目的可利用不完全切割的限制段（incomplete restricted fragments）之選殖以及『染色體走路』（chromosomal walks）等技術來達成[82]，今在技術上已大致無困難。如此則可不必建立基因的更詳細資料，甚至不必知曉該基因的生化產物，便能遂行基因轉移工作而達到果樹育種目標[87]。

遺傳工程

一、急速發展中的新技術

遺傳工程又稱爲基因操作（gene manipulation）、重組核酸技術（recombinant DNA technology）、和基因選殖（gene cloning）等；其涵意爲：利用人爲方法將兩種核酸分子銜接在一起，成爲一種核酸嵌合體（DNA chimera）的技術[70,71,72]。遺傳工程自從1970年代初期以來即迅速發展，目前雖然未臻成熟，卻已有頗可觀的成就，並展現巨大的應用潛力於未來；其應用範圍已從微生物學和藥物學擴展至動植物的遺傳研究與品種改良。

若單從植物的立場而言，所謂遺傳工程即是應用基因重組方法將外來基因整合到植物的基因組，並使其發生正常功能以改良作物的技術[94]。採用這種途徑改良植物時，所導入的基因可以不拘來源，因此不受任何血緣和物種間的障礙之限制。其整個過程包括下列四大部份：(1)分離有用的基因；(2)建立重組體；(3)將重組體轉入植物細胞，形成轉形細胞（transformed cells）；(4)將轉形細胞培育成新植株，成爲『轉殖植株』（transgenic plant），以供篩選與測試。雖然四大程序的技術發展一直呈現參差不齊的狀況，但遺傳工程之大量應用於植物育種（包括果樹在內）則已呈現指日可待之勢。

二、尋求所需的基因

尋求基因時，須先明瞭該基因在遺傳上所扮演的角色，並測知其位置，以便分離和選殖。此外，了解基因的結構，包括基因的字碼區（coding area）和調控區（regulatory area）之序列，將有助於該基因的分離與轉移。可惜這方面的知識和技術至今仍無長足進步。雖然應用cDNA（互補DNA）的合成技術可輕易地藉著植物的mRNA（訊息RNA）得到大量不含『插入序列』（intron）的基因序列，並加以選殖；但此技術並不能直接提供有關基因功能的知識。根據粗略的估計，大部份眞核生物的基因組約含有五萬個基因[38]，可見高等植物的基因極爲繁多。雖然有些基因由於僅在特殊情況或特定階段才會表現其特性（例如與種子成熟有關的基因），以致其cDNA的有無和多寡可提供辨認該基因的線索；但一般而言，欲從cDNA中去認識基因的功能，將如同海底撈針一般，極易徒勞無功。最近發展成熟的PCR技術（Polymerase Chain Reaction）爲基因的找尋提供了一個新的途徑[68]，它可利用蛋白質多胜鏈兩端的氨基酸序列推測其基因兩端的核酸序列（須考慮各種組合的可能性），以之作爲引子（primer）便可合成整個基因，因此蛋白質可作爲尋找基因的線索。只要知道基因的兩端之序列（約20左右之氮基對長度）或其蛋白質產物便可能找到該基因，此一技術可望有助於基因的探索；然而對於未知其兩頭之核酸序列或其蛋白質產物的基因而言，則於事無補。

另一種可能性則是配合基因圖的使用，直接選殖涵蓋有用基因的核酸片段以爲轉移之用[87]。由於此一方法須先建立包括RFLP標誌和其他遺傳性狀標誌的詳細基因圖，因而極待努力，但其遠景則是樂觀的。

雖然植物基因的探索目前尙極待努力，而植物的種類又十分衆多，將來的工作必定極其繁重，但整個大局仍屬樂觀。此乃由於不同物種間的同功能基因可能具有相同或相似的核酸

序列，此一特性已得到一部份証實，例如茄科內不同屬的植物之間便具有許多相同序列的核酸，只是在染色體上的排列順序不相同而已[16]。另外，動物的分子生物學研究已証明某些已知基因的核酸序列在不同物種之間有十分明顯的相似性，例如胰島素基因便是。如此則任何物種的已知基因皆可能當作探針，用以找出其他物種的同功能基因。將來植物學家甚至包括其他生物學家或許可以聯合進行基因的探索工作，使得各種基因的分離和選殖得以成眞。

三、重組質體的建立

重組質體即是把要轉移的基因透過形成核酸嵌合體的方法接到適當的質體內。此質體是把外來的基因轉入植物基因組的媒介，故一般稱爲基因之載體（vector）。常用的載體皆是經過設計和改造的環形核酸，其主要部份可能包括：(1)T-DNA片段，此爲取自*Agrobacterium tumefaciens*腫瘤菌的Ti質體之核酸片段，它具有自動移位（transposition）並插入植物染色體的功能。經改進過的T-DNA具有固定的選殖位置（cloning sites），可供外來基因之嵌入，以便隨著T-DNA的移位而轉移到植物的基因組內。(2)報告者基因（reporter gene），此乃爲了便於偵測基因轉移是否成功以及所轉移基因之活性（意即基因在轉後是否仍然保持其功能），而於建造載體時特地嵌入的基因。一般使用的報告者基因具有兩種特色，其一爲：其基因產物很容易偵測，因而易於確知轉移之結果；其二爲：原先不存在於供試植物內，或是在植物內含量極爲微少，如此可提高偵測之準確性。常用的報告者基因有：NPT II（Neomycinphosphotransferase），CAT（Chloramphenicol acetyltransferase），和GUS（β glucuronidase）等來自細菌之酵素基因。報告者基因若代以其他有用的基因，便可使再生的植物帶有該基因之特性，而達到品種改良的目的。(3)複製基因（replicator），例如pBR322 Ori序列，以爲質體的複製之需。另外，爲了便於基因選殖的初期篩選作業，有些質體還帶有其他特色，例如可抗某種抗生素的基因 。

四、基因轉移

基因轉移意指將前述所建立的重組質體轉入植物細胞內，形成轉形細胞。例如將外來基因係選殖在T-DNA內，以便隨著T-DNA的移位而插入植物染色體，其插入之位置則爲逢機者[26]。將重組質體導入細胞而形成轉形細胞的方法，爲近年來遺傳工程技術中進步最大的部門。如今所開發的重要方法有：*Agrobacterium*腫瘤菌感染法、基因槍法（gene gun）、微注射法（micro-injection）、和電孔法（electroporation）等。此外尚有：花粉管途徑（pollen-tube pathway）、植物原生質體之直接轉形（transformation of protoplast），和經由重組的病毒載體（recombinant viral vectors）之感染…等方法。各種方法的主要特色約如表一所示[28,34,58,70,71]。

五、轉殖植株的獲得及其測試與篩選

轉形細胞必須發展成整棵植株，即轉殖植株；而獲得轉殖植株以後，則須確定外來基因是否已轉入植物細胞內，方能達成以遺傳工程改良作物的目的。遺傳工程技術已具備迅速而可靠的方法，用來確認含有外來基因的植株；然而外來基因的轉入並不能保證品種改良的成

功。此乃因為外來基因在轉移時是逢機地插入於植物染色體上，故其插入的位置並不能隨意掌握[26]。倘若外來基因適巧插在不理想的地方則會引發副作用，例如它可能插在植物染色體的某個基因上，致使該被插入的植物基因發生突變或喪失正常功能。再者，外來基因整合到植物基因組後是否仍然發揮預定功能，則更是作物改良成敗的最大關鍵。何況外來基因本身亦可能遭到分解或修改之命運。職是之故，如何產生大量的轉殖植株以供田間篩選，便成了很重要的技術與步驟。

從轉形的細胞獲得新植株的途徑約如表一所示，大部份方法需要藉組織培養的再生途徑，以形成新的植株。因此，對許多不易再生的木本植物而言，便形成一個瓶頸；尤其是以原生質體為材料的方法更容易因再生之困難而失敗。經由花粉管途徑和病毒感染的方法則可不經組織培養而避開再生的問題，雖然此兩種方法尚未臻理想；但其未來的發展格外值得的果樹育種家的注意。

六、遺傳工程與果樹育種

利用遺傳工程改良作物時可以不受生物血緣的限制，並且不需經過基因型的『拆散』與『組合』過程，亦即不必經由雜交而造成性狀分離，再由一系列的育種選拔程序回復優良基因型。它可使育種工作避開許多棘手的技術問題（指本文前述之造成果樹育種困境的諸多因素），而直接致力於特定性狀的改進。由於許多果樹是以無性方法繁殖，且具有高度異質之基因型，使得基因轉移技術在果樹品種改良上更具吸引力。然而遺傳工程在果樹育種的應用仍有如下兩大瓶頸：㈠、由於遺傳工程至今尚未脫離技術開發的歷史階段，加以吾人對生物基因的知識尚十分有限，因而限制了眼前的實用性。㈡、木本植物的某些特性使現有的技術模式較難應用在果樹上，例如許多果樹的組織培養和再生技術尚有待突破；又如核酸的純化方法常因植物種類的不同而引發不同難題，而此一技術對大部份果樹而言則仍未加以探討；因而可以想見將來果樹的基因轉移可能會因基本技術的不足而遭遇到許多問題。不過吾人對於此一急速成長的技術體系仍然值得抱持樂觀的態度，對於特殊的技術問題則可逐漸予以克服。例如，採用*Agrobacterium*的感染方法，柑桔已基本上建立了有效的基因轉移模式[66]；利用柑桔原生質體的轉形以直接吸收外界 DNA（重組質體）的基因轉移方法亦有進展（J.W.Grosser，個人交談資料）；在桃子已有人藉著cDNA的選殖以探測高品質基因（high quality fruitgenes）[22]；而其他果樹在這方面的投入和努力亦將是值得的。

結論

由於受到木本植物生育特性之影響，果樹育種先天上即有較多限制和困難。為了提昇育種效率以促進果樹產業發展，新觀念的引入和新科技的應用實屬必要。本文就生物技術的特質及其發展現況，肯定其對果樹育種的意義與價值。然而，作為一門新興的科技而言，生物技術本身亦含有諸多限制與缺點，例如其技術發展尚未完全成熟、各種應用效果仍無妥善評估、以及目前國內仍較欠缺有關的設備與人才等等；加以許多果樹的基礎研究尚未能充分配

合，使得生物技術在果樹育種的應用更形困難。

筆者以爲，爲提高生物技術在果樹育種上的應用潛力，應當加强下列諸項研究工作：(一)組織培養的再生技術之開發，使更多果樹得以利用組織培養途徑獲得變異材料，以供篩選；並可爲遺傳工程的應用立下基礎。(二)加强胚乳培養技術的研究。由於無籽品種的需求是許多果樹育種的目標之一，因而在胚乳培養上，舉凡新培養基的開發、培養期間的生理現象、以及遺傳因素對胚乳培養的影響等，皆值得加以探討，以便建立有效率的胚乳培養技術體系。(三)在細胞融合方面，若能建立花粉原生質體與雙倍體細胞之原生質體的融合技術，則可望同時達到遠緣雜交與無籽果樹育種等目標。由於花粉壁的成分不同於一般細胞壁，在產生花粉原生質體技術上尙極待突破（J. W. Grosser，個人討論資料），但這方面的努力與突破將極具應用潛力。(四)以基因重組技術建立重要果樹類的基因庫和核酸探針，以便建立各主要品種的RFLP基因型資料。如果同一種果樹類（例如柑桔、桃、梨、蘋果、葡萄等類別）皆能建立一組常用的探針（數目至少在20-30之間），則可爲國內主要果樹品種和品系建立最精確可靠的鑑別資料，供作種源庫檔案以及育種人員選擇親本和實施子代篩選的基本依據。(五)果樹RFLP連鎖圖的建立。RFLP連鎖圖對育種的價值已如上述，以RFLP連鎖關係作爲經緯，且將有助於已知之園藝性狀的標定。因此，重要果樹類的RFLP連鎖圖之繪製將是極有價值的工作。(六)建立果樹的基因轉移模式。雖然至今大部份果樹的組織培養研究仍付缺如，已建立再生方法的種類更是寥寥無幾；但是如能在已知其再生方法的果樹中選擇比較廣受研究而資料較爲豐富者（例如柑桔、葡萄、和蘋果等），探討基因的轉移技術，將有助於果樹遺傳工程的發展。現今雖無『上市的』園藝性狀基因可供果樹遺傳工程使用，然而若能巧妙地利用目前可用的基因於轉移之研究上，亦不失爲良策。例如，若將細菌中可抗某種抗生素的基因（如抗kanamycin者）轉入柑桔中，使其對該抗生素產生抗性，再以之作爲父本，與多胚性的『正常』品種雜交，則可望在種子發芽後施用抗生素而輕易地分辨出珠心胚苗（珠心胚苗將因無法忍耐抗生素而黃化或死亡；部分雜交苗則可保持正常）。此一假設經由轉殖植株和『正常』植株的比較試驗，已經得到初步證實（G. A. Moore，未發表）。由於苗木胚性鑑別之困難，使柑桔的多胚性成爲選擇雜交母本時的一大限制，時常影響育種成效；上述之構想則有助於突破這種限制。因此，巧妙的構思有時可使技術開發寓於實際應用中，增加試驗研究的經濟效益。

表一、各種基因轉移方法的特色

轉移方法	材料	基因載體	產生新植株的途徑	備註
Agrobocterium感染	植物組織	質體DNA	組織培養	不利於單子葉植物使用
基因槍射入法	癒傷組織、子葉、下胚軸懸浮細胞等	質體DNA	組織培養	
微注射法	原生質體	質體DNA	組織培養	
電孔法	原生質體	質體DNA	組織培養	
花粉管途徑	花器	質體DNA	種子	
原生質體轉移	原生質體	質體DNA	組織培養	
病毒感染	植株或組織	病毒DNA	自動由感染細胞擴散至整個植株	尙無理想之病毒載體、且病毒的寄主種類太狹窄

參考文獻

1. 太田次郎和室伏君子 編著，上野洋一郎 編譯. 1989. 生物技術名詞彙編。藝軒圖書出版社，289 PP.
2. 何偉眞. 1988. 植物組織培養在誘變育種上的應用。國科會生命科學研究推動中心專刊第十六集：生物技術專題演講論文集(二)，許麗卿、曾義雄、和陳慶三合編，國科會發行。PP. 115-119.
3. 胡適宜. 1985. 被子植物胚胎學。新華書店北京發行所，264 PP.
4. 陳其昌和張穎. 1974. 花藥培養與單元體育種。科學農業 22(5-6)：95-103.
5. 黃新川. 1986. 香蕉組織培養植株之變異。中國園藝 32(2)：117-125.
6. 蔡新聲. 1986. 花藥培養在作物育種上之應用。生物技術在農業上之應用研討會論文集，農委會出版。PP. 28-38
7. 蔡新聲. 1988. 植物組織培養在農業上之應用。國科會生命科學研究推動中心專刊第十六集：生物技術專題演講論文集(二)，許麗卿、曾義雄、和陳慶三合編，國科會發行。PP. 99-114.
8. Altman, A. and R. Goren. 1971. Promotion of callus formation by ABA in Citrus bud cultures. Plant Physiol. 47：844-846.
9. Arulsekar, S. and D. E. Parfitt. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. HortScience 21(4)：928-933.
10. Arulsekar, S., D. E. Parfitt, W. Beres, P. E. Hansche. 1986. Genetics of malate dehydrogenase isozymes in the peach. J. Hered. 77：49-51.
11. Baba, A., S. Hasezawa, and K. Syono. 1986. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by Agrobacterium spheroplasts. Plant Cell physiol. 27 (3)：463-471.
12. Bergh, B. O. 1979 Avocados. In：J. Janick and J. N. Moore (eds.), Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press. West Lafayette, Indiana. PP. 541-567.
13. Bevan, M. W. and M-D. Chilton. 1982. T-DNA of the agrobacterium Ti and Ri plasmids. Ann. Rev. Genet. 16：357-384.
14. Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1983. Plant tissue culture：theory and practice. Elsevier. New York. 502PP.
15. Bonga, J. M. 1977. Applications of tissue culture in forestry. In：J. Reinert and Y. P. S. Bajaj (eds.). Plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag. New York. PP. 93-108.
16. Bonierbale, M. W., R. L. Plaisted, and S. D. Tanksley. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and

tomato. Genetics 120 : 1095-1103.

17. Botstein, D., R. L. White, M. skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32 : 314-331.

18. Brewer, G. J., C. F. Sing, and E. R. Sears. 1969. Studies of isozyme patterns in nullisomic-tetrasomic combinations of hexaploid wheat. Proc. Natl. Acad. Sci. 64 : 1224-1229

19. Brown, A. G. 1979. Apples. In : J. Janick and J. N. Moore (eds.). Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press. West Lafayette, Indiana. PP. 3-37.

20. Burr, B., S. V. Evola, and F. A. Burr. 1983. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In : J. K. Setlow and A. Hollaender (eds.), Genetic engineering : principle and methods. Plenum Press. New York and London. PP. 45-59.

21. Button, J. and J. Kochba. 1977. Tissue culture in the Citrus industry. In : J. Reinert and Y. P. S. Bajaj (eds.). Plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag. New York. PP. 70-92.

22. Callahan, A., E. Walton, D.Wydoski, and P. Morgens. 1987. Searchintg for high-quality fruit genes from peach (*Prunus persica*). HortScience 22(5) : 1111.

23. Cameron, J. W. and R. K. Soost. 1984. Citrus. In : N. W. Simonds (ed.). Evolution of crop plants. Longman. New York. PP. 261-264.

24. Chang, C., J. L. Bowman, A. W. DeJohn, and E. S. Lander. 1988. Restriction fragment length polymorphism linkage map for Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 6856-6860.

25. Chen, Z. 1985. A study on induction of plants from Citrus pollen. Fruit Varieties Journal 39(2) : 44-50.

26. Chyi, Y-S, R. A. Jorgensen, D. Goldstein, and S. D. Tanksley. 1986. Locations and stability of Agrobacterium-mediated T-DNA insertions in the Lycopersicon genome. Mol. Gen. Genet. 204 : 64-69.

27. Collins, J. L. 1968. The pineapple. Leonard Hill. London. 294 PP.

28. Crossway, A., H. Hauptli, C. M. Houck, J. M. Irvine, J. V. Oaks, and L. A. Perani. 1986. Micromanipulation techniques in plant biotechnology. Biotechniques 4(4) : 320-334.

29. Dodds, J. H. 1983a. Tissue culture of Citrus. In : J. H. Dodds (ed.), Tissue culture of trees. Avi Pub. Westport, Connecticut. PP. 80-87.

30. Dodds, J. H. 1983b. Tissue culture of hardwoods. In : J. H. Dodds (ed.), Tissue culture of trees. Avi pub. Westport, Connecticut. PP. 22-28.

31. Doyle, J. J., J. L. Doyle, and L. H. B. Hortorium. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12(1) : 13-15.

32. Dunwell, J. M. 1985. Haploid cell culture : a practical approach. IRL Press. Oxford and Washington DC. PP. 21-36.

33. Durham, R. E., G. A. Moore, and W. B. Sherman. 1987. Isozyme banding patterns and their usefulness as genetic markers in peach. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112(6) : 1013-1018.

34. Fromm, A., L. P. Taylor, and V. Walbot. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proc. Natl. Dci. USA. 82: 5824-5828.

35. Gardner, R. C. and C. M. Houck. 1984. Development of plant vectors. In : T. Kosuge and E. W. Nester (eds.), Plant-microbe interactions vol. I. PP. 146-167.

36. Gebhardt, C., C. Blomendahl, U. Schachtschabel, T. Debener, F. Salamini, and E. Ritter. 1989. Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (Solanum tuberosum, ssp. tuberosum) with RFLP-fingerprints. Theor. Appl. Genet. 78 : 16-22.

37. Gmitter, F. G. 1985. Citrus embryogenesis in vitro : Culture establishment, and phenotypic characterization. Doctorial dissertation. University of Florida. 142 pp.

38. Goodenough, U. 1984. Genetics. 3rd ed. Saunders college pub. New York. 894 PP.

39. Grosser, J. W. 1986. Citrus cultivar improvement via somatic hybridization. Proc. Fla. Stats Hort. Soc. 99 : 36-37.

40. Grosser, J. W., F. G. Gmitter, Jr. and J. L. Chandler. 1988. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species : *Citrus sinensis* and *Severinia disticha.* Thero. Appl. Genet. 75 : 397-401.

41. Grosser, J. W., G. A. Moore and F. G. Gmitter, Jr. 1989. Interspecific Somatic hybrid plants from the fusion of 'Key' lime (*Citrus aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis*) protoplasts. Sci. Hort. 39 : 23-29.

42. Helentjaris, T. 1987. A genetic linkage map for maize based on RFLPs. Trends in genetics 3(8) : 217-221.

43. Helentjaris, T., G. King, M. Slocum, C. Siedenstrang, and S. Wegman. 1985. Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant MolecularBiology 5 : 109-118.

44. Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Schaefer, and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymor phisms. Theor. Appl. Genet. 72 : 761-769

45. Herman, E. B. 1986. First disease-resistant trees from tissue culture. Agricell Rep.

7(2) : 9.

46. Hesse, C. O. 1979. Peaches. In : J. Janick and J. N. Moore (eds.), Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press. West Lafayette, Indiana. PP. 285-335.

47. Johri, B. M. and P. S. Rao. 1984. Experimental embryology. In : B. M. Johri (ed.), Embryology of angiosperms. Springer-Verlag. New York. PP. 735-802.

48. Johri, B. M. and S. S. Bhojwani. 1977. Triploid plants through endosperm culture. In : J. Reinert and Y. P. S. Bajaj (eds.), Plant cell, tissue, and organ culture. Springer-verlag. New York. PP. 398-411.

49. Kam-Morgan, L. N. W. and B. S. Gill. 1989. DNA restriction fragment length polymorphisms : A strategy for genetic mapping of D genome of wheat. Genome 32 : 724-732.

50. Klein, Y. M., E. D. Eolf, R. Wu, and J. C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327 : 70-73.

51. Kochba, J. and P. Spiegel-Roy. 1977. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of Citrus. HortScience 12(2) : 110-114.

52. Kochba, J., P. Spiegel-Roy, and H. Safran. 1972. Adventive plant ovules and nucelli in Citrus. Planta 106 : 237-245.

53. Lander, E. S. and D. Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121 : 185-199.

54. Lander, E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln, and L. Newburg. 1987. Mapmaker : an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1 : 174-181.

55. Landry, B. S., R. V. Kesseli, B. Farrara, and R. W. Michelmore. 1987. Genetic map of lettuce (*Lactuca sativea* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. Genetics 116 : 331-337

56. Larkin, P. J. and W. R. Scowroft. 1981. Somaclonal variation anovel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60 : 197-214.

57. Layne, R. E. C. and A. Harvey. 1979. Pear. In : J. Janick and J. N. Moore (eds.), Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press. West Lafayette, Indiana. PP. 38-70.

58. Lazo, G. R., R. Roffey, and D. W. Gabriel. 1987. Pathovars of Xanthomonas campestris are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. Intl. J. Syst. Bacteriol. 37 : 214-221.

59. Ling, J., N. Nito, and M. Iwamasa. 1990. Somatic hybridization between *Citrus reticulata* and *Citropsis gabunensis* through electrofusion. HortScience 25(9) : 1155.

60. Liou, P. 1990. A molecular study of the Citrus genome through restriction fragment length polymorphism and isozyme mapping. Doctorial dissertation. University of Florida. 143 PP.

61. Luo, Z. -X. and R. Wu. 1988. A Simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. Plant Mol. Biol. Rep. 6(3) : 165-174

62. Maclean, N. 1987. Macmillan dictionary of genetics and cell biology. Macmillan press. London and Basingstoke. 422 PP.

63. McCouch, S. R., G. Kochert, Z. H. Yu, Z. Y. Wang, G. S. Khush, W. R. Coffman, and S. D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76 : 815-829.

64. McMillin, D. E. 1983. Plant isozymes : a historical perspective. In : S. D. Yanksley and T. J. Otron (eds.), Isozyme in plant genetics and breeding, Part A. Elsevier. New York. PP. 3-13.

65. Meyerowitz, E. M. and R. E. Pruitt. 1985. *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. Science 229 : 1214-1218.

66. Moore, G. A. and K. Cline. 1987. Genetic transformation studies in *Citrus* using the *Agrobacterium tumefaciens* vector system. HortScience 22(5) : 1111.

67. Moore, G. A. and R. E. Litz. 1984. Biochemical markers for *Carica papaya, C. caulifora,* and plants from somatic embryos of their hybrid. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 : 213-218.

68. Mullis, K. B. and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in enzymology 155 : 335-349.

69. Ohgawara, T., S. Kobayashi, E. Ohgawara, H. Uchimiya, and S. Ishii. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata.* Theor. Appl. Genet. 71 : 1-4.

70. Old, R. W. and S. B. Primrose. 1985. Cloning in plant cells. In : N. G. Carr, J. L. Ingraham, and S. C. Rittenberg (eds.), Principles of gene manipulation. Blackwell Sci. Pub. Boston, Massachusetts. PP. 203-230.

71. Old, R. W. and S. B. Primrose. 1985. Principles of gene manipulation : an introduction to genetic engineering, 3rd ed. Blackwell Sci. Pub. Boston, Massachusetts. 409 PP.

72. Oliver, S. G. and J. M. Ward. 1987. A dictionary of genetic engineering. 3rd ed. Canbridge Univ. New York. 153 PP.

73. Osborn. T. C., D. C. Alexander, and J. F. Fobes. 1987. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. Theor. Appl. Genet. 73: 350-356

74. Paterson, A. H., E. S. Lander, J. D. Hewitt, S. Peterson, S. E. Lincoln, and S. D. Tanksley. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. Nature 335(20) : 721-726.

75. Paterson, A. H., J. W. Deverna, B. Lanini, and S. D. Tanksly. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. Genetics 124 : 735-742.

76. Pierik, R. L. M. 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publ. Boston. 344 PP.

77. Raghavan, V. 1977. Applied aspects of embryo culture. In : J. Reinert and Y. P. S Bajaj (eds.), Plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag. New York. PP. 375-397.

78. Ragone, D. 1990. Isozyme variation in pacific island cultivars of breadfruit. HortScience 25(9) : 1153.

79. Roose, M. L. 1988. Isozymes and DNA restriction fagment length polymorphisms in citrus breeding and systematics. In : R. Goren and K. Mendel (eds.), Proceedings of the sixth international citrus congress. Margraf Sci. Books. Weikersheim. PP. 57-67.

80. Roose, M. L. and S. N. Prechtl. 1987. DNA restriction fragment length polymorphisms in Citrus. HortScience 22(5) : 1111.

81. Rosati, P. 1975. Anther culture of strawberry. HortScience 10(2) : 119-120.

82. Sarfatti, M., J. Katan, R. Fluhr, and D. Zamir. 1989. An RFLP marker in tomato linked to the *Fusarium oxysporum* resistance gene I2. Theor. Appl. Genet. 78 : 755-759.

83. Scott, D. H. and F. J. Lawrence. 1979. Strawberry. In : J. Janick and J. N. Moore (eds.), Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press. West Lafayette, Indiana. PP. 71-97.

84. Skirvin, R. M. 1981. Fruit crops. In : B.V. Conger (ed.), Cloning agriculturalplants via in vitro techniques. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. PP. 51-139.

85. Soller, M. and J. S. Beckmann. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet. 67 : 25-33.

86. Tanksley, S. D. and J. Hewitt. 1988. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato, a re-examination. Theor. Appl. Genet. 75 : 811-823.

87. Tanksley, S. D., N. D. Young, A. H. Paterson, and M. W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding : new tools for an old science. Biotechnolngy 7 : 257-264

88. Torres, A. M. 1983. Fruit trees. In : S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.), Isozymes in plant genetics and breeding, Part B. Elsevier. New York. PP. 401-421.

89. Torres, A. M., R. K. Soost, and T. Mau-Lastovicka. 1982. Citrus isozymes : genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. J. Hered. 73 : 335-339.

90. Torres, A. M., T. Mau-Lastovicka, T. E. Willams, and R. K. Soost. 1985. Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozymes genes. J. Hered. 76 : 289-294.

91. Tsay, H. S. and C. Y. Su. 1985. Anther culture of papaya (*Carica papaya* L.) Plant Cell Reports 4 : 28-30.

92. Tspfer, R., M. Prols, J. Schell, and H. -H. Steinbiss. 1988. Transient gene expression in tobacco protoplasts : II. Comparison of the reporter gene systems for CAT, NPTII, and GUS. Plant Cell Reports 7 : 225-228.

93. Vallejos, C. E. 1983. Enzyme activity staining. In : S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.), Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. Elsevier. New York. PP. 469-516.

94. Watson, J. D., J. Tooze, and D. T. Kurtz. 1983. Recombinant DNA, a short course. Freeman. New York. 260 PP.

95. Werner, D. J. and D. F. Moxley. 1990. Relationship between malate dehydrogenase genotype and plant vigor in peach. HortScience 25(9) : 1153.

96. Yeung, E. C., T. A. Thrope, and C. J. Jensen. 1981. In vitro fertilization and embryo culture. In : T. A. Thorpe (ed.), Plant tissue culture-methods and applications in agriculture. Academic Press. New York. PP. 253-271.

Biotechnology in Fruit Tree Breeding

by
Pam-chi Liou
Taiwan Agricultural Research Institute

ABSTRACT

Cultivar improvement in most fruit trees has been difficult via conventional breeding techniques. Recently biotechnology has provided new approaches and possibility for fruit tree breeding, therefore, it is very possible to enhance the efficiency of breeding by using this newly developed tool. This paper presents some potential applications of biotechnology in fruit-tree cultivar improvement, including tissue culture, protoplast fusion, RFLP mapping, and gene transfer.

Key Words : Fruit trees, breeding, biotechnology, isozyme, RFLP, genetic engineering, tissue culture.